

豚における胚移植の現状ならびに展望

農林水産省畜産試験場 小栗紀彦

豚における胚移植の最初の成功例は1951年ソ連のKvasnickiiによって報告され、その後、1960年代前半に外科的手法による胚の採取ならびに移植の術式がほぼ確立した。豚の胚移植技術は1960年代後半に妊娠初期の諸現象の解明手段として主に研究面で利用されたが、多産で妊娠期間が比較的短い豚では胚移植技術の産業面で利用価値は小さいと考えられており、胚移植に関する研究は活発には行われていなかった。ところが、最近、防疫を考慮した閉鎖集団への新しい遺伝形質の導入や胚の国家間の輸送、SPF豚群の作出等への胚移植技術の応用ならびに体外受精、胚の凍結保存、形質転換子豚の作出が注目され始め、豚におけるこの分野の研究が急速に活発化した。

①胚の採取ならびに移植のための開腹手術

ケタミンの筋肉注射による前処置の後、4%ハロセンを含んだ、笑気2：酸素1の混合気によって麻酔の導入を図る。供試豚を仰臥位に手術台に保定し、ハロセン濃度を1～2%に下げて維持麻酔に移る。術野を剃毛、洗浄、消毒した後、切開部位を除いて豚体を滅菌手術布で覆う。左右の最後位乳頭を結んだ線と正中線との交点より3～5cm後方から前方に正中線に沿って約15cm切皮する。皮下脂肪を切開創に沿って、左右に指で鈍性に白線まで開く。白線を正中線に沿って約12cm切開し、白線・腹膜間の脂肪を鈍性に開いた後、腹膜を剪刀で切開する。切開孔より子宮角、卵管、卵巢を露出させる。

胚の採取あるいは移植が終了した後、露出させた生殖器を腹腔に戻し、腹膜、白線、皮下脂肪、皮膚の順に縫合する。

②胚の採取

子宮角基部背面に眼科用剪刀を用いて小孔を作る。2wayバルンカテーテルをその小孔より挿入し、バルンを膨らませてカテーテルを保定した後、およそ45mlの灌流液を子宮角に注入する。灌流液を子宮角先端部まで送り、胚を灌流液に浮遊させた後、先端部から下向性に灌流液を移動させ、カテーテルを通して100ml試験管に回収する。灌流終了後、子宮角に作った小孔を1針縫合し、内膜組織の反転脱出を防ぐ。回収した灌流液を方眼付きペトリ皿に移し、実体顕微鏡下で胚を検索する。この方法による胚の採取率は85～90%と良好である。

③胚の移植

受胎豚の生殖器を切開孔から引出し、子宮角先端部から約5cmの部位に鈍針を用いて小孔を作る。胚を吸引したパスツールピペットをその小孔より子宮角腔内に挿入し、少量の媒液とともに胚を移植する。豚では胚の子宮内移走が高率で起こるので、胚の移植は左右いづれかの側に行えばよい。

④移植成績

演者らが1頭当たり10個以上の胚(平均14個、範囲10～26個)を移植した157頭の受

豚(同期化の程度：-2日～+1日)では、106頭(68%)が分娩し、平均産子数は6.3頭(範囲1～14頭)であった。1頭当たり平均14個(範囲11～18個)の胚を118頭の受胎豚(同期化の程度：-2日～+1日)に移植し、妊娠30日目に屠殺して受胎を確認したPolge(1982)の成績は受胎率69%(82/118)である。これらの成績は同様の傾向を示しており、供胚豚の発情発現と同日あるいは1日または2日遅れで発情を現した受胎豚に移植した場合、高い受胎率が得られている。

⑤胚移植後の妊娠維持に必要な胚数

豚では妊娠を継続するためには妊娠の極初期に4個より多くの生存胚が子宮内に存在する必要があると言われているが、その詳細は不明であった。演者らが行った妊娠維持に必要な胚数を検討するための移植実験では、受胎豚1頭当たり2胚以上の移植で妊娠例が得られており、3胚移植群の受胎率(67%)と2胚移植群の受胎率(20%)との間に有意差が認められた。

⑥非外科的な胚の採取

豚における非外科的な胚の採取は子宮角の形態的特徴から困難であるが、予め外科的に子宮角を短縮した雌豚では、頸管経由法による非外科的な胚の採取を反復することが可能となる。この方法による採取率は極めて良好であり、子宮角を著しく短縮したにもかかわらず、正常な胚盤胞を採取することが出来る。

⑦非外科的な胚の移植

屠殺した供胚豚から採取した胚を非外科的に移植したPolge & Day(1968)は移植胚由来の胎児を報告しているが、受胎率は極めて低かった。その後、非外科的胚移植はほとんど試みられていなかったが、最近、腹腔鏡を用いた非外科的胚移植による受胎例ならびに頸管を経由して移植した胚から発育した子豚が日本で報告された。

⑧豚胚の凍結保存

豚の胚は低温の影響を受け易く、+15℃より低い温度まで冷却されると、その生存性を失うと言われていたが、最近、-5℃に冷却された豚胚の生存性が培養で証明されたのに続き、数グループの日本の研究者が活発に研究を進め、+11℃まで冷却された豚胚から発育した生存胎児、-35℃まで冷却された胚より発育した子豚が報告された。その後、演者らの研究室での液体窒素(-196℃)中で凍結保存の成功に続き、全農、昭和産業でも豚胚の凍結保存に成功している。

⑨胚移植技術による疾病伝播の制御

近年、牛、豚、綿羊でウイルス性疾病感染動物、あるいは抗体陽性動物から採取した胚を抗体陰性動物に移植した場合、受胎動物ならびに移植胚由来の子畜で抗体陽性が証明されないことから、胚移植による伝染性疾病的制御の可能性が示唆された。現在、胚移植技術による伝染性疾病的制御は、汚染動物群の清浄化への利用、胚の形で行われる遺伝形質の流過程における防疫および屠場材料を用いた体外受精由来胚の利用に伴う疾病伝播の防止の観点から注目を集めている。

豚では、豚コレラ、オーエスキー病、豚水泡病、豚バルボで胚移植による伝播の制御に関する報告がみられる。演者らがのべ233頭のオーエスキー病抗体陽性豚から採取した2,437個の胚を、189頭の抗体陰性豚に移植した結果、受胎豚189

頭の内116頭が分娩に至り、716頭の子豚が生産された。用いた全ての受胚豚および生産された全ての子豚でオーエスキー病抗体陰性であることが証明された。Jamesら(1983)もオーエスキー病抗体陽性豚から採取した805個の胚を抗体陰性豚34頭に移植し、受胚豚および生産された208頭の子豚ともに抗体陰性であったと報告している。これらの結果は胚移植技術がオーエスキー病汚染豚群の清浄化に有効に利用できることを示している。また、オーエスキー病ウイルスあるいは豚バルボウイルスを胚とともに培養して電子顕微鏡で観察した結果、透明帯の表面にはウイルスが認められるが、透明帯の内部には認められていない。さらに、透明帯が完全な胚であれば、豚コレラウイルスに曝しても、10回洗浄すれば感染しないとされている。これらも胚移植技術によって伝染性疾病の伝播を防ぐことができる可能性を示しているが、鼻腔内と子宮内とにオーエスキー病ウイルスを接種した雌豚から採取した胚あるいは高濃度のウイルスを含んでいる媒液に曝した胚を移植した場合、受胚豚に伝播したと報告されているので、胚移植技術を介しての伝播条件はさらに検討される必要がある。

⑩豚における体外受精

体外受精胚由来の最初の子豚は Chengら(1986)によって報告され、わが国でも Yoshida(1987)、Nagaiら(1988)が子豚を作出している。豚におけるこの分野の研究は活発化し始めており、最近では、完全体外培養系による体外受精胚由来の子豚も報告されている(Mattioli, 1989)。多数の胚を生産することができる体外受精技術は応用範囲が広く、産業技術としての利用の他、受精の機序の解明、胚の初期発生に影響する諸要因の検討における材料の供給、さらに、体外受精では発生段階の揃った受精初期卵を顕微鏡下で多数作出できるので、受精初期卵を体外で操作しなければならない卵子への核移植、卵子への外来遺伝子導入の研究における材料の提供等研究面での応用に期待が寄せられている。

⑪受精卵への遺伝子導入

遺伝子導入による形質転換子豚の生産がメタロチオネイン(MT)をプロモーターとして ヒト成長ホルモン(hGH)遺伝子を豚受精卵に導入した Hammerら(1985)によって報告されて以来、豚における形質転換の試みは他動物種のGH(成長ホルモン)遺伝子の導入による成長促進や肉質改善を目的としたものが多い。Rexroadら(1988)の総説によると7,610個の遺伝子注入胚が移植され、618頭(8.1%)の子豚が生産されている。内48頭(7.8%)に遺伝子が組み込まれ、発現の有無を検定した36頭中21頭(58.3%)でその発現が確認されている。

豚において胚の凍結保存を含む胚移植技術が確立すると、優良豚の増殖、伝染性疾病の制御、遺伝形質の効率的輸送ならびに保存等、産業技術としての実用が期待できるだけでなく、繁殖生理学における研究手段として、また発生工学的研究における基礎技術としての利用も期待できる。さらに、体外受精技術の開発が進展するに伴い、発生工学的研究における材料としての成熟卵、受精卵、胚、割球、核、胚性幹細胞株の効率的生産が可能となり、クローン豚、形質転換豚の作出に関する研究が加速度的に発展すると考えられる。